

週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り、東京大学医学部の医学部研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントのうえで、文書で同意を得た症例に対して研究を実施する。また、提供試料、個人情報厳格に管理・保存する。

#### C. 研究結果

子宮頸部粘膜に抗E7細胞性免疫(E7特異的IFN $\gamma$ 産生、GranzymeB産生細胞)が誘導された。また子宮頸部リンパ球の約25%は腸管粘膜由来のintegrin b7+細胞であることから経口投与によって腸管粘膜を介して免疫が誘導されたと考えられる。末梢血の抗E7細胞性免疫よりも子宮頸部の方が優位であった。GLBL101cの投与量に依存的に抗E7細胞性免疫能が上昇し、また8週目のブースターによって細胞性免疫能が上昇した。

臨床効果としては、1, 2cap/d内服群の4例においては、CIN3病変が残存し、円錐切除術を必要としたが、4cap/d内服群では3例全例がCIN1-2に退縮し、臨床的有効性が示され、手術を回避できた。

#### D. 考察

乳酸菌をベースにHPV16E7癌蛋白

質を発現させた抗HPV治療ワクチン (GLBL101c内服) は、癌免疫療法として新規の抗癌剤になりうる。子宮頸部における免疫学的有効性とCIN3治療効果(奏効率)が相関していることから本治療薬による効果を見ていると考えられる。

#### E. 結論

子宮頸癌の初期病変は若年女性に頻発し、増加している。その治療法は現在のところ手術療法しかない。本研究では粘膜免疫を誘導する新しい癌免疫療法としてGLBL101cを開発し、その臨床的有効性を証明しつつある。今後症例数を増やし、免疫学的有効性と言えるカットオフ値の設定、投与量の増量に伴う臨床的有効性の増強効果を検討する必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614-11623, 2010
- 2) Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K, Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with

- surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. *J Obstet Gynecol Res*, 36: 757-763, 2010
- 3) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol*, Mar 31. [Epub ahead of print], 2010
- 4) Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810-2817, 2010
- 5) Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K. Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. *Am J Clin Oncol*, [Jan 15, Epub.], 2010
- る HPV E7 を標的にした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、シンポジウム 20 癌免疫療法、京都、10 月
- 3) 川名 敬ら、子宮頸がん前癌病変に対する乳酸菌を利用した HPV 治療ワクチンの第 I/IIa 相臨床試験症例における有効性の免疫学的解析、日本癌学会、大阪、9 月。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 川名 敬ら、CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日本産科婦人科学会総会、東京、4 月。
- 2) 川名 敬ら、子宮頸癌前癌病変に対す

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

HPVの生活環の解明と、それを利用した抗腫瘍剤の探索

分担研究者 酒井 博幸 京都大学ウイルス研究所・准教授

研究要旨

HPV感染は子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。HPV感染による悪性腫瘍形成を抑えるためには、このウイルスの複製機構を解明することが重要である。本研究課題ではHPVの生活環を解明し、その情報に基づいて抗ウイルス剤、抗腫瘍剤の新規の標的を同定することを目指している。

【新規複製系を利用したHPV遺伝子機能の解析】

すでに報告した新規HPVレプリコンを用いたHPV複製系を改変し、ウイルスライフサイクルとHPV各制御遺伝子の機能を評価する系を構築した。その系を利用してHPV制御遺伝子の機能の検討を行い、E4、E5、E6、E7はゲノム維持に必須ではないことを示した。

【E7による過形成誘導機構の解析】

E7による過形成誘導に、p63アイソフォームの発現変化が関与している可能性を示した。

【E4/E5と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4、E5と相互作用する宿主因子の検索を行い、HoxC9やDnaJなどの候補因子を同定した。

A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（human papillomavirus: HPV）は標的組織である重層上皮に感染し、疣贅やコンジローマなどの良性腫瘍を誘発する病原ウイルスである。形成された腫瘍は多くの場合自然治癒するが、一部は長期にわたり持続感染し、まれに悪性腫瘍へと進展することが知られている。特に子宮頸がんでは、ほぼ全ての症例でHPVの感染が確認されており、HPVの感染が子宮頸がん発症の主要なリスクファクターであると考えられている。また、子宮頸がん以外でも肛門がんや頭頸部扁平上皮癌（head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC）への関与も示されており、このウイルスの感染を予防・治療する戦略を考案することが重要となっている。

本研究課題ではHPVの生活環を分子レ

ベルで解明し、その知見に基づいてHPV感染に対する抗ウイルス剤や抗腫瘍剤の分子標的を提案することを目的としている。HPVの遺伝子発現や複製は、感染標的である上皮細胞の分化状態に強く依存しているために、通常組織培養法ではその生活環を支持することが出来ない。この研究ではHPVの複製をサポートできる皮膚モデル培養系やセミソリッド培地培養法などを利用してHPVの生活環を再現し、その感染・複製機構を解明することにした。また、細胞に導入するHPV DNAの改良や、遺伝子導入法の最適化についても検討を加えた。

B. 研究方法

【HPV複製系の構築】

HPV-FL (FL for full-length) 型の構築は、HPV11, 16, 18型のゲノムDNAを制限酵素処理やライゲーション反応に

よってつなぎ換え、両端に LCR 配列を持つようなウイルスゲノムを構築した。これを pEGFP1 (クロンテック) を改変した G418 耐性プラスミド内に挿入したものを HPV-FL とした。

HPV-S (S for self-ligation) 型の複製系では, HPV6b, 11, 16, 18 型の全ゲノムを含むプラスミドからウイルス DNA 領域のみを切り出し, それらを T4 DNA ligase によって環状化したものをゲノム型 DNA として利用した。HPV DNA を維持する細胞を選別する目的で, 各 HPV 由来の複製起点 (ori 配列または LCR) を含むネオマイシン耐性プラスミド (HPV-ori plasmid または LCR plasmid) を構築した。

HPV の各遺伝子に変異を導入する際には, polymerase chain reaction (PCR) を利用した oligonucleotide-directed mutagenesis を用いた。変異の導入は PCR 操作を行った部分の全配列を検証することで確認した。

#### 【細胞培養】

HeLa, CV1, 293T, ヒト繊維芽細胞 (human foreskin fibroblast; HFF, クラボウ) は 10%FBS/DMEM を用いて, 5% CO<sub>2</sub> 37°C 条件において培養した。ヒト角化細胞 (human foreskin keratinocyte; HFK, クラボウ) は専用の培地 (EpiLife-KG2, クラボウ) を用いて, 同条件で培養した。

#### 【遺伝子導入】

HeLa, CV1, 293T に対しては通常の DNA-リン酸カルシウム共沈法を用いて transfection を行った。HFF, HFK はそれぞれ専用の試薬を用いて transfection を行った (nucleofector kit, AMAXA)。

#### 【サザンプロット解析】

細胞からのウイルス DNA の抽出には SDS-proteinase K を用いた total DNA 回収法を利用した。一部エピゾーム状の DNA のみを回収する目的で Hirt の方法を適用した。回収した DNA は制限酵素処理によって線状化し, それをアガロースゲルで泳動したものをナイロンメンブ

レンに転写した。検出/可視化には DIG-標識・検出試薬を利用した (ロシユ)。通常のサザン法と DIG 検出法の組合せで十分な感度が得られない場合には, HPV の L1 領域を標的とした PCR と DIG 検出法を組み合わせ用いた。

#### 【皮膚モデル培養系】

真皮モデルは HFF をコラーゲンゲルに埋め込み, 数日の間収縮させることで構築した。このゲルの表面に HFK を重層させ, さらに HFK 表面を空気に晒すことによって HFK は層状化および分化し, 皮膚モデルが構築される。

#### 【ウイルスベクターの構築】

ras や HPV 遺伝子を HFK に遺伝子導入する際には, MuLV ベースのレトロウイルスベクターを用いた。導入する遺伝子に応じて, LXS, LPCX (Clontech) を使い分け, それぞれの plasmid に目的遺伝子を挿入したものを作成した。ウイルスベクターの産生は, 各 plasmid を pCL10A1 パッケージングベクター (Retrogen) とともに 293T 細胞に transfection し, 培養上清中に放出されたウイルスベクターを回収し利用した。

#### 【yeast two-hybrid assay (YTH)】

E4, E5, E7 と相互作用する因子の同定には YTH アッセイを利用した。実験系には市販のキットを利用し, cDNA ライブラリーも同様に, HeLa 細胞由来の cDNA を挿入した市販品を用いた (インビトロジェン)。

#### 【GST-pull down 法】

GST 融合蛋白は, pGEX ベクターを用いて大腸菌 HB101 株の中で発現させたものを, グルタチオンビーズで精製して利用した。結合を確認する宿主因子は reticulocyte lysate を用いた in vitro 翻訳系を利用して合成した。宿主因子は合成時に <sup>35</sup>S 標識を行っている。結合は一般的なプロトコルに従って行い, GST 融合蛋白に結合した蛋白をイメージアナライザー (BAS5000, 富士フイルム) によって検出した。

【メチルセルロース懸濁培養, および分化マーカーの確認】

1.5%メチルセルロース/EpiLife-KG2にHFKを懸濁し、10~48時間培養することで分化誘導を行った。分化マーカーの発現誘導は transglutaminase, filaggrinをWestern法によって検出することで行った。

#### 【FACSによる細胞周期解析】

細胞は必要に応じてメタノール固定、あるいはフォルマリン固定し、PI染色によって染色体をマークし、EPICS XL-MCL (Beckman Coulter) を用いてFACS解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

この研究の遂行において用いた実験材料や方法は個人情報、および倫理面での問題を生じない。

### C. 研究結果

#### 【新規複製系を利用したHPV遺伝子機能の解析】

HPV-FL型のレプリコンを利用したHPV複製系に関してはすでに学術誌に報告済みである (Cancer Sci., 2010)。従来の方法に比べFL型を利用すると、効率よく安定にHPV DNAを維持した細胞を得ることが出来、また細胞分化に応じたHPVの産生的複製 (vegetative replication) も再現可能である。

このFL型を用いた実験系を利用して、I型インターフェロンによりHPV複製抑制効果を検証することができた。またある種のキナーゼ阻害剤を標的とした化合物で、HPVの産生的DNA複製が抑制できることも確認した。これらの結果は、FL型を用いた実験系が抗HPV化合物の評価系として利用可能であることを示している。

FL型レプリコンを用いた実験はHPV研究に役立つと考えられるが、DNAサイズがかなり大きくなり、ウイルスゲノムとしてパッケージングされない点や、構造が本来のゲノムDNAとはかなり異なり、HPVゲノムの機能を完全に再現しているとはいえない点が問題となる。そこで従来法に用いられていたHPV-S型DNAを利

用して、HPV DNAを維持した細胞を効率よく得る方法を考案した。従来法でS型DNAを用いる場合、transfectionされた細胞の選別にpSV2neoなど、薬剤耐性遺伝子を発現するプラスミドを同時に細胞に導入し、1週間程度薬剤による選択を行っていた。この選別法ではtransfection時にHPV-S型DNAとpSV2neoがco-transfectionされたものを回収することが可能であるが、HPV DNAに関しては何ら選択圧がかかっていない。そのために薬剤で選別した細胞を経代しているうちにHPV DNAが欠落する可能性があり、また、HPV DNAを維持できない細胞が回収した細胞プールに含まれていると考えられる。この問題を避ける目的で、薬剤選択用のプラスミドにHPVの複製起点を含むDNAを組み込んだ。このプラスミドはHPV DNAの複製に応じて、細胞内で複製することが可能であり、細胞を長期にわたって薬剤選択することが出来る。ここで回収された細胞は全て、HPVの複製を支持していることも保証される。

この新しい複製系を用いた場合、薬剤選択後に残った細胞内でのHPVの平均コピー数はFL型と同程度、従来法に比べると数倍~10倍程度多いことが分かり、本来のHPVゲノムDNAを用いて効率の良い複製系が確立できたことが分かった。さらにこの系を利用して、HPV16, HPV18でE1, E2, E4, E5, E6, E7にナンセンス型点変異を導入した変異体を作成した。これらを導入したHFKを用いてraft cultureを構築し、HPVライフサイクルにおける各遺伝子の意義の解析を開始しているが、現在までにE1, E2を除く各遺伝子は、HPVのゲノムメンテナンスに必須ではないことが分かった。ただしE6の変異体に関しては、長期培養時のウイルスコピー数が野生型に比べ著しく低下しており、E6はゲノム複製効率に関与している可能性が示された。また多くの経代を経たHFKではE7が細胞増殖性維持に必須であり、E7を欠失した変異体では見かけ上メンテナンスされないと

いう結果が得られた。また E6 の変異体に関しても、E7 ほどではないが、やはり細胞増殖性の維持に関与しているという知見を得ている。

更に HPV ゲノム DNA を保持した細胞に対してメチルセルロース懸濁培養法による分化誘導処理を行ったところ、E4 と E5 の変異体に関して、分化依存的な DNA 複製に関与しているという知見が得られた。この結果に関しては現在、詳細に検討中である。

#### 【E7 による過形成誘導機構の解析】

高リスク型 HPV の E7 を HFK に発現させ、それを用いて raft culture を構築すると表皮層に強い過形成が誘導される。この過形成誘導機構として我々は E7 によるポケット蛋白 (pRb と p130) の不活化に関与していることを見だし、すでに報告している (Oncogene 25: 4155-4164, 2006)。しかし低リスク型 HPV E7 でも有意の過形成が誘導されること、また pRb や p130 の発現抑制では E7 ほど強い過形成が誘導されないことから、その他の因子の関与が考えられた。そこで重層上皮形成に関与するキープクターである p63 に注目した。p63 には大きく分けて 2 つのアイソフォームが存在する。正常 HFK を用いて raft culture を構築し p63 の発現プロファイルを解析すると、基底層細胞で TA 型が、分化層で  $\Delta N$  型の発現が確認された。それに対して E7 発現 HFK を用いた場合は、分化層で TA 型の発現が認められ、 $\Delta N$  型の発現誘導が阻害されていることが観察された。このことはハイリスク型の E7 に固有の現象であり、pRb 経路の下流に p63 の発現調節が存在する可能性を示唆している。

#### 【E4/E5 と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4 は HPV 感染組織では主に分化層で高発現していることが報告されている。また機能としては中間径フィラメントであるサイトケラチンのネットワークを崩壊させることが知られている。しか

しその生物学的な意義はよく分かっていない。一方でサイトケラチンネットワークの崩壊とは独立に、E4 の発現によって細胞増殖が G2/M 期で停止することを中原らが報告している (J. Virol. 76: 10914-10920, 2002)。また、E4 は E7 によって誘導された細胞増殖促進シグナルを打ち消し、細胞分化を可能とするという知見を我々は得ている。

ここでは E4 の機能に関する情報を集める目的で、E4 と相互作用する因子の同定を行った。同定には酵母を用いた Two-hybrid 法を利用し、その相互作用は GST-pull down や細胞内共局在を検証することで確かめた。相互作用する因子はいくつか同定され、その中にはスプライス関連因子としても知られる PRP8 や、発生期に関与し、癌との関連や皮膚での発現が示されている HoxC9、中間径フィラメント蛋白の vimentin, co-chaperon の機能を持つ DnaJ が含まれた。

また機能のよく分かっていない HPV の E5 についても同様の検索を行った。ここでは DNA 損傷修復に関わる Ku70, ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 Fat の orthologue などを同定した。

現在これら宿主因子と E4/E5 との相互作用の生物学的意義を検証中であり、その作用が明らかになると、新規の抗ウイルス剤の標的として利用できると思われる。

#### D. 考察

##### 【新規複製系を利用した HPV 遺伝子機能の解析】

HPV-FL 型は遺伝子導入や、その後の細胞内維持の効率が高く、細胞内での HPV ゲノムの複製や遺伝子発現、細胞への影響を調べる上では優れたレプリコンであると考えられた。この系をメチルセルロース懸濁培養法や raft culture と組み合わせることで、抗ウイルス活性を持つ化合物や抗腫瘍剤の評価検討が可能であることも示すことができた。

しかし FL 型レプリコンでは感染性ウイルスを産生できない点や、未知の人為

的要素を含んでいる可能性が否定できず、HPV の生活環の解明という点では問題があると指摘されてきた。そこで従来法同様に、HPV ゲノム DNA の構造を保持し、かつ導入細胞の選別・維持の効率が低いと思われる新規の複製系を構築した。予想された通り、transfection 時の遺伝子導入効率では FL 型に及ばなかったが、HPV DNA の維持効率では FL 型と同程度、従来法より有意に良いという結果が得られた。この系は HPV ライフサイクルの解析を行う上で優れたプラットフォームとなることが期待される。

HPV の制御遺伝子である E1, E2, E4, E5, E6, E7 に関して、それぞれいくつかの生物機能が報告されているが、ウイルスの生活環における役割はあまり知られていない。そこで今回得られた複製系を利用し、これを raft culture に応用することで、各遺伝子の役割に関する知見が得られると考えている。この点は今後の重要な課題である。

これまでに E6 や E7 が HPV ゲノムのメンテナンス（長期維持）に必要であるという報告がいくつか出されていた。しかし今回の解析から、これらの遺伝子はゲノムメンテナンスに必須ではないことがしめされた。ただし E6 変異体では細胞内ゲノムコピー数が著しく減少していたことから、ゲノム DNA の複製効率や細胞間の分配等に関与している可能性が考えられた。この実験条件下で E6 と E7 は細胞増殖性の長期維持に必要であったことが分かった。

E4 と E5 に関してはメチルセルロース懸濁培養法を用いた実験から、分化に応じた DNA 複製の活性化に関与しているという知見が得られた。しかしこの結果は単層培養条件下のものであり、raft culture などの分化誘導系における検証が必要であると考えている。

#### 【E7 による過形成誘導機構の解析】

HPV 感染組織ではコンジローマなどの良性腫瘍が形成される。これは高リスク型、低リスク型共通の特質である。HPV 感染による過形成誘導機構としては、E7

によるポケット蛋白の不活化の他に、E6 による PDZ 蛋白の分解や E5 の関与が示されている。我々は以前 E7 による過形成誘導を raft culture で再現し、その分子機構として pRb と p130 の分解誘導を示した。しかし、E7 による過形成誘導機構の説明としては十分ではなく、その後の解析を継続していた。そこで p63 発現パターンの変更も過形成誘導に関与している可能性が示唆された。重層上皮組織での、細胞分化に応じた p63 発現プロファイル変化の分子メカニズムは明らかではなく、E7 による発現調節機構の解明を通して、その詳細が解明されるのではないかと考えている。p63 の発現パターンは低リスク型 E7 では修飾されず、p63 発現調節の上流に pRb-E2F が存在する可能性が示唆された。pRb も p130 同様に、細胞分化に関与するという報告も多いことから、pRb-p63 経路の存在の可能性も十分にあると考えられる。

#### 【E4/E5 と相互作用する新規宿主因子の検索】

E4, E5 と相互作用する宿主因子の同定をすすめ、いくつかの候補因子を見いだした。未だ、その生理的意義は分からないが、いくつかは HPV の複製や細胞分化調節、腫瘍形成に関与する可能性を持っていると考えられた。E4 や E5 は、これまでに行われている HPV ゲノム DNA での変異解析や、その raft culture への応用でも、明確な役割は分かっていない。今回得られた候補因子の発現や機能変化を通して、E4, E5 の新規生物機能が明らかになることを期待しており、現在解析をすすめている。

#### E. 結論

今回は新規 HPV 複製系の改良と、それを用いた reverse genetics による、遺伝子機能解析を行った。未だ途中段階であるが、HPV 複製制御機構を理解する上で重要なアッセイ基盤になると考えられ、今後の抗ウイルス剤開発や、そのスクリーニングに貢献するものと期待される。

また E7 による過形成誘導機構に関しても、新たな分子機構の解明をすすめており、感染初期の腫瘍形成を抑制する上での重要な分子標的となる可能性がある。初期の腫瘍形成は悪性腫瘍への転換の重要なステップと考えられ、このステップを阻害できれば悪性腫瘍への進展を阻止、あるいは遅延できる可能性が考えられる。

HPV 制御遺伝子の中で、その役割がよく分かっていない E4 と E5 についても、その機能が明らかになれば、その知見に基づいて抗ウイルス剤の分子標的の同定をすすめることが可能となる。今回得られた候補因子の HPV 複製における役割を明らかにし、抗ウイルス剤開発に貢献したいと考えている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Satsuka, A., Yoshida, S., Kajitani, N., Nakamura, H., and Sakai, H.: A novel human papillomavirus type18 replicon and its application in screening the anti-viral effects of cytokines. *Cancer Sci.* 101: 536-542, 2010.

### 2. 学会発表

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: エストロジェン刺激による HPV 陽性細胞の増殖制御. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: Mechanisms of the HPV-induced transformation. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.

佐塚文乃, 梶谷直子, 酒井博幸: Novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the antiviral effects of cytokines. 第 33 会日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010.

### 3. 総説

佐塚文乃, 酒井博幸. HPV のライフサイクル. *Visual Dermatology*, 9: 264-271, 2010.

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・**分担**）研究報告書

ヒトパピローマウイルス(HPV)タイピング法の再検討

分担研究者 森 清一郎 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨 最近の研究により、多くの女性が複数の型のHPVに同時感染していることがわかってきた。現行HPVワクチン、及び、開発中の次世代HPVワクチンの効果を知るためには、検体中に複数の型のHPVが混在しても、それらを正確に検出し、型判定（タイピング）できる技術が必要である。PCRによるHPVタイピングに広く使用されてきた型共通プライマーの特性を調べた。型共通プライマーでは、一部の型の検出感度が低かったり、検体中に2つの型が混在すると、一方の型のDNA増幅が強く阻害される場合があった。型共通プライマーを使用した過去のデータでは、複合感染するHPVが正確に検出されていない可能性がある。近年開発された、複数の型特異的プライマーを混ぜた混合プライマー等を使用して、感染しているHPVの型別分布を正確に知る必要がある。

A. 研究目的

現行のHPVワクチンは、子宮頸がんの原因となる15の高リスク型HPVのうち16、18型を対象としている。また、我々は、全ての高リスク型HPVに有効な次世代ワクチンの開発を進めている。HPVの感染は、子宮頸部擦過細胞等の検体からDNAを抽出し、PCRでHPV DNAを増幅、型判定（タイピング）する方法で調べられる。最近の研究により、多くの女性が複数の型のHPVに同時感染（複合感染）していることがわかってきた。したがって、ワクチン導入による型別感染率の変化や、次世代HPVワクチンの効果を臨床試験において調べるには、検体中に複数の型のHPVが混在しても、それらを正確に検出できる技術が必要である。HPVタイピングには、これまで、それ

ぞれ1種類のフォワードプライマーとリバースプライマーで全ての高リスク型HPV DNAを増幅する型共通プライマーが広く用いられてきた。型共通PCRプライマーの特性を、特に、複合感染の検出精度に注目して調べた。

B. 研究方法

これまで国内外で広く用いられてきた型共通プライマー、L1C1/L1C2C2M、MY09/11、GP5+/6+について調べた。比較として、近年開発された、複数の型特異的プライマーを混ぜた混合プライマーであるPGMY09/11、MGPを用いた。クローニングされたHPV16、18、51、52、58型ゲノムを用い、各プライマーの型ごとの検出感度を調べた。次に、6000コピーの16型DNAと6000、600、60、6コピーのその他の型のDNA、及び、

50ngのヒトDNAを混合した試料を調整し、各プライマーを用いてPCR増幅した。アンプリコン内の型特異的配列をプローブとし、Reverse Line Blotによって型を判定した。また、混合プライマーによって16型を含む複数のHPV型が検出された臨床検体について、リアルタイムPCRで各型のDNAのコピー数を調べ、型共通プライマーでタイピングを行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体の入手にあたっては各機関の倫理委員会の承認のもと患者のインフォームドコンセントを得ている。また、使用にあたっては検体名を符号化することにより患者のプライバシーの保全に万全を期している。

#### C. 研究結果

L1C1/L1C2C2Mの16、18、51、52、58型DNAの検出限界は、それぞれ、60、6、6、60、60コピーだった。MY09/11の16、18、58型DNAの検出限界は、いずれも600コピーで、51、52型DNAは6000コピーあっても検出できなかった。GP5+/6+の16、18、52、58型DNAの検出限界は、それぞれ、60、60、600、6000コピーで、51型DNAは6000コピーあっても検出できなかった。L1C1/L1C2C2Mでは、6000コピーの16型DNAと6000コピーの18、または、51型DNAが混在した場合、16型DNAが検出されなかった。臨床検体のタイピングで、MY09/11とGP5+/6+では51、52型を、L1C1/L1C2C2Mでは16型を検出できない場合が多く、

例えば、52、16型がそれぞれ1700、1300コピー含まれる検体で、MY09/11、GP5+/6+では、16型しか検出されなかった。また、16、18、31型がそれぞれ、16000、5200、3100コピー含まれる検体、及び、18、16型がそれぞれ、4300、290コピー含まれる検体で、L1C1/L1C2C2Mでは、16型が検出されなかった。

#### D. 考察

検体中に1種類の型のDNAしか存在しない場合、L1C1/L1C2C2Mは幅広い型に対して高い検出感度を示し、特に、18と51型DNAの増幅効率が高かった。従って、18、または、51型が反応液中に混在すると、他の型の増幅が強く阻害されると考えられる。L1C1/L1C2C2Mは、これまで主に我が国におけるHPV流行型の調査に使用されてきた。これらの報告では、HPV陽性患者での複合感染率は、10-20%とされている。混合プライマーを用いた最近の海外での研究では、複合感染率は45%とする報告もあり、L1C1/L1C2C2Mなどの型共通プライマーでは、複合感染を正確に検出できていない可能性がある。

#### E. 結論

型共通プライマーは、HPVの複合感染の検出には適さない。PGMY09/11やMGPなどの混合プライマーを用いて、感染しているHPVの型別分布を正確に知る必要がある。

#### G. 研究発表

## 1. 論文発表

Mori S, Nakao S, Kukimoto I,  
Kusumoto-Matsuo R, Kondo K, Kanda T.  
Biased amplification of HPV DNA in  
specimens containing multiple HPV types  
by PCR with consensus primers. Cancer Sci  
(in press).

Ishii Y, Tanaka K, Kondo K, Takeuchi T,  
Mori S, Kanda T. Inhibition of nuclear  
entry of HPV16 pseudovirus-packaged DNA  
by an anti-HPV16 L2 neutralizing  
antibody. Virology 406: 181-8 2010.

## 2. 学会発表

石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、  
森清一郎、神田忠仁 高リスク型共通中和  
抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV)  
感染抑制機構 第58回日本ウイルス学会学  
術集会 (徳島)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV 持続感染機構の解析と複製阻害剤による感染排除に関する研究

分担研究者 中川俊介 東京大学医学部 女性診療科・産科 講師

研究要旨 子宮頸癌の発症およびその不死化にはHPVの癌蛋白E6によるヒトの癌抑制蛋白のユビキチンプロテアソーム系による分解が深く関与している。このメカニズムをプロテアソーム阻害剤により遮断することにより子宮頸癌の進展を阻害できる可能性がある。近年のドラッグデリバリーシステムの進歩により、ミセルにこのプロテアソーム阻害剤を内包させることにより、薬剤の安定化とその効果の持続を試みた。MG132内包ナノミセルは主要組織への集積性を獲得し、その高い抗腫瘍効果が確認された。マウス移植腫瘍において、MG132内包ナノミセルはE6の分解の標的となる癌抑制蛋白の発現を回復することにより、抗腫瘍効果を示すと考えられた。

A. 研究目的

子宮頸癌の発症およびその不死化にはHPVの癌蛋白E6によるヒトの癌抑制蛋白のユビキチンプロテアソーム系による分解が深く関与している。このメカニズムをプロテアソーム阻害剤により遮断することにより子宮頸癌の進展を阻害できる可能性がある。近年のドラッグデリバリーシステムの進歩により、ミセルにこのプロテアソーム阻害剤を内包させることにより、薬剤の安定化とその効果の持続が期待できる。

B. 研究方法

我々は、プロテアソーム阻害剤であるMG132をナノミセルに内包化するシステムを東大工学部の片岡研と共同で開発した。ミセルの直径は約100nmであった。このMG132内包ナノミセルをもちいて、その血中での安

定性を調べるために、ミセルに蛍光ラベルを付着させ、マウスの尾静脈から投与し、蛍光色素の発現を調べることにより、安定性を検討した。また、HPV 18型陽性のHela細胞にGFPの蛍光を発現させた細胞をマウスに移植して、GFPを発現したHela細胞にミセル化したMG132が集積するかを、in vivo共焦点顕微鏡で検討した。また、移植した頸癌由来細胞の移植腫瘍がMG132内包ナノミセルによりどの程度縮小するかを調べた。癌蛋白E6により分解される癌抑制蛋白p53、hDlg, hScrib等の癌抑制蛋白の発現回復を、頸癌細胞移植モデルにおいて調べた。

（倫理面への配慮）

特に必要なし

C. 研究結果

蛍光ラベルしたMG132内包ナノミセルは裸剤のMG132に比べて、血中の滞留時間が長く、血中で安定性があることが示された。また、MG132内包ナノミセルはGFPを定常的に発現したHela細胞の移植片に特異的に集積することが明らかとなった。子宮頸癌由来移植腫瘍の縮小効果は裸剤のMG132に比べて、MG132内包ナノミセルの方が高い傾向を示した。移植頸癌組織中において癌蛋白E6により分解される癌抑制蛋白p53、hDlg, hScrib等の癌抑制蛋白の発現回復を検討したところ、ウエスタンブロットにより、これらの分解の標的とされる蛋白の発現が回復していることが示された。

#### D. 考察

プロテアソーム阻害剤であるMG132をミセル化した製剤は、HPV E6癌蛋白の標的となる癌抑制蛋白を効率に発現回復させることより、ミセル化したプロテアソーム阻害剤がその作用を正確かつ安定的に腫瘍の内部において発揮することで抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

#### E. 結論

プロテアソーム阻害剤であるMG132をミセル化した製剤はin vivoにおいて血中で安定であり、頸癌モデルの移植腫瘍に集積することから、本製剤は新規ドラッグデリバリーシステムを用いた新しい子宮頸癌に対する分子標的製剤となりうる可能性が示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y. Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Med Oncol*. Mar 6 2011

Hiraike H, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tanikawa M, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Oda K, Shoji K, Fukuhara H, Saji S, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br J Cancer* 102: 1061-7. 2010

Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y. Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Med Oncol*. Mar 10 2011

Koyama S, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Tanikawa M, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor suppressor DBC1. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 357-62. 2010

Maeda D, Chen X, Guan B, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M, Wang TL, Shih Ie M. Rsf-1 (HBXAP) expression is associated with advanced stage and lymph node metastasis in ovarian clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 30: 30-5.2011

Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Ohashi K, Mori M, Imamura T, Nakagawa S, Yano T,

Taketani Y, Fukayama M. Mucosal carcinoma of the fallopian tube coexists with ovarian cancer of serous subtype only: a study of Japanese cases. *Virchows Arch* 457: 597-608.2010

Maeda D, Takazawa Y, Ota S, Takeuchi Y, Seta A, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fukayama M. Bilateral microscopic adenocarcinoma of the fallopian tubes detected by an endometrial cytologic smear. *Int J Gynecol Pathol* 29: 273-7.2010

Murayama-Hosokawa S, Oda K, Nakagawa S, Ishikawa S, Yamamoto S, Shoji K, Ikeda Y, Uehara Y, Fukayama M, McCormick F, Yano T, Taketani Y, Aburatani H. Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in the PI3-kinase pathway. *Oncogene* 29: 1897-908.2010

Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomaic V, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L. The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction. *Oncogene* 29: 5311-21.2010

Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol.* Mar 31 2010

Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y,

Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y. Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function. *Br J Cancer.* Mar 15 2011

## 2. 学会発表

Takayuki Seiki, Shunsuke Nakagawa, Michihito Tanikawa, Osamu Hiraike, Tetsu Koyama, Yuichiro Miyamoto, Tomoko Kashiya, Yuji Ikeda, Keiko Shoji, Katsutoshi Oda, Tetsu Yano, Yuji Taketani Deleted in breast cancer-1 is targeted for the ubiquitin-mediated degradation by human papillomavirus E6 oncoprotein. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Osaka, Japan)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

産業財産権（特許権）国外PCT出願  
PCT/JP2010/052556

プロテアソームインヒビター内包高分子  
ミセル

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発

分担研究者 大和 建嗣 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 講師

#### 研究要旨

HPV16感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7を標的とした RNAi 医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究で HPV16 関連癌細胞株の増殖抑制に有効な siRNA 配列を見いだした。siRNA は、RNAi 活性が高い反面、非特異的効果（オフターゲット効果、細胞毒性）が強く、また血清存在下では不安定であった。本研究で短 2 本鎖 RNA-DNA キメラ型核酸を用いることによってこれらの siRNA の問題点を克服できることを示した。また、dsRDC は、E6E7 不死化ケラチノサイトの増殖も特異的に抑制し高度異型上皮/早期癌の治療への応用の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的 (200) 226

子宮頸部高度異型上皮は、HPV16 型など高リスク HPV が原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6 および E7 を高発現し、これらの抑制で病変が排除できるため理想の治療標的ある。2 本鎖 RNA-DNA キメラ (dsRDC) は siRNA のシードアームを 2 本鎖 DNA に置換したもので、日本発の siRNA に代る RNAi 技術である。本研究では HPV16 E6E7 を標的とした dsRDC の RNAi 活性とその特異性について siRNA と比較し、核酸医薬として利用可能かを検討する。

#### B. 研究方法 (400) 364

HPV16 E6E7 に対する siRNA と dsRDC について、RNAi 活性の評価は、HPV16 陽性子宮頸癌細胞株 (SiHa) を用いたルシフェラーゼアッセイと定量的 RT-PCR

によって解析した。増殖抑制効果と細胞毒性は、HPV16 陽性細胞 (SiHa、E6E7 不死化ケラチノサイト) と陰性細胞 (HeLa、TERT 不死化ケラチノサイト) を用いて解析した。RISC 形成能と miRNA 発現に及ぼす効果は、HeLa 細胞にトランスフェクション後 RISC を免疫精製し、stem-loop RT-PCR で短鎖 RNA を定量した。オフターゲット効果は、ルシフェラーゼアッセイと定量的 RT-PCR で解析した。血清安定性は、50% 血清中 37°C インキュベーションし、R それぞれの RNAi 活性の半減期を解析した。

(倫理面への配慮)

患者由来のサンプルは使用していない。

### C. 研究結果 (400) 324

HPV16 E6E7を標的とするdsRDCは、siRNAに比較して、(1) オフターゲット効果が少ない；(2) 細胞毒性が低い；(3) 血清安定性が高い (siRNAの半減期は0.5時間で dsRDCは8時間)；(4) miRNA発現の抑制効果が低い；(5) siRNAがパッセンジャー鎖をRISCに取り込むことがあるのに対して、dsRDCは常にガイド鎖のみを取り込む、などの多数の優位点が見られた。反面、dsRDCはRISC形成能が低いことに一部起因するRNAi活性の低下があるが、本研究でこの問題も改善することができた。またE6E7を標的にしたdsRDCは、E6E7不死化ケラチノサイトの増殖も特異的に抑制し、高度異型上皮の治療応用に可能であることを示した。

### D. 考察 (100) 128

HPV16 E6E7を標的とする従来型siRNAは、非特異反応性と細胞毒性が高いが、これには、オフターゲット効果、パッセンジャー鎖によるRISC形成、miRNA生成抑制などが関与していると思われる。dsRDCに変換することによってこれらの副作用が抑制できた。

### E. 結論 (100) 101

dsRDCは、siRNAよりもHPV関連疾患のRNAi医薬候補として多くの点で優れていることを明らかにした。さらにRNAi活性を高め、これらの病変部位へのデリバリー法の確立によって医薬

としての利用できる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Endo, S., Yamato, K., Hirai, S., Moriwaki, T., Fukuda, K., Suzuki, H., Abei, M., Nakagawa, I., Hyodo, I. Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 3:605-613, 2011

Yamato, K., Egawa, K., Endo, S., Ui-Tei, K., Yamada, T., Saigo, K., Hyodo, I., Kiyono, T., Nakagawa, I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification. *Cancer Gene Ther.* submitted

#### 2. 学会発表

Yamato K, Nakajima T, Nakagawa I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification 第33回日本分子生物学会年会 平成22年12月 (神戸) Abs 1P-1236

Endo S, Suzuki H, Hirai S, Hyodo I, Yamato K. The anti-tumor effect of MDM2 antagonist nutlin-3 in gastric cancer cell in vitro and in vivo. American Association of Cancer Resersearch 101st Annual Meeting 2010, (Washington, DC) Abs 4530



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請準備中

【発明の仮名称】 遺伝子発現阻害剤  
及び阻害方法

### Ⅲ 研究結果に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中原知美 清野 透	第8章 ウイルス性腫瘍 のマウスモデル	秋山徹 奥山隆平 河府和義	マウス・ラット疾患モデル 活用ハンドブック	羊土社	東京	2011	142-62
佐塚文乃 酒井博幸	HPVのライフサイクル	江川清文	Visual Dermatology	秀潤社	東京	2010	267-71
中川俊介	HPVと子宮頸癌 発癌機構	吉川裕之	産科と婦人科	診断と治療社	東京	2010	116-122

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida K Sugimoto N Iwahori S Yugawa T Narisawa-Saito M Kiyono T Fujita M	CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells.	J Cell Sci.	123	225-35	2010
Aoyagi T Takahashi M Higuchi M Oie M Tanaka Y Kiyono T Aoyagi Y Fujii M	The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation	Virus Genes	40	193-9	2010
Ito S Ozawa S Ikoma T Yajima N Kiyono T Hata R.	Expression of a chemokine BRAK/CXCL14 in oral floor carcinoma cells reduces the settlement rate of the cells and suppresses their proliferation in vivo.	Biomed Res	31	199-206	2010

Iwakawa R Kohno T Enari M Kiyono T Yokota J	Prevalence of human papillomavirus 16/18/33 infection and p53 mutation in lung adenocarcinoma.	Cancer Sci	101	1891-6	2010
Kasahara K Goto H Enomoto M Tomono Y Kiyono T Inagaki M	14-3-3gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage.	EMBO J	29	2802-12	2010
Mori N Kyo S Nakamura M Hashimoto M Maida Y Mizumoto Y Takakura M Ohno S Kiyono T Inoue M	Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer.	Br J Cancer	103	889-98	2010
Roy BC Kohno T Iwakawa R Moriguchi T Kiyono T Morishita K Sanchez-Cespedes M Akiyama T Yokota J	Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells.	Lung Cancer	70	136-45	2010
Yugawa T Narisawa-Saito M Yoshimatsu Y Haga K Ohno S Egawa N Fujita M Kiyono T	DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells.	Cancer Res	70	4034-44	2010
Fujiwara S Nawa A Luo C Kamakura M Goshima F Kondo C Kiyono T Kikkawa F Nishiyama Y	Carrier cell-based delivery of replication-competent HSV-1 mutants enhances antitumor effect for ovarian cancer.	Cancer Gene Ther	18	77-86	2011